

**IUT « A » PAUL SABATIER
TOULOUSE III
Département Génie Biologique
24, rue de l'Embaquès
32000 AUCH
Tel : 05 62 61 63 12
Fax : 05 62 61 63 01**

**CIRAD
UMR AGAP
TA A-108/C
Campus International de Baillarguet
34 498 MONTPELLIER Cedex 5
Tel : 04 67 59 37 28
Fax : 04 67 59 37 32**



RAPPORT DE STAGE DE FIN DE DIPLOME

**Etudes mycologiques et moléculaires à partir de mycélium pur de *Ganoderma boninense*,
impliqué dans le dépérissement des palmiers à huile.**



Athéna SEYED ESMAÏL
Promotion Agronomie 2011



Encadrant : Docteur Alba ZAREMSKI
stage du 27 mars 2011 au 24 juin 2011

REMERCIEMENTS

Tout le long de mon stage j'ai été soutenue par de nombreuses personnes qui ont su me faire partager leur savoirs et m'ont apporté leurs suggestions concernant l'avancée de ce projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon maître de stage, Alba ZAREMSKI, qui m'a donné beaucoup d'autonomie, de confiance, Jean-Marc BOUVET le chef de l'unité de recherche GFP « Diversité Génétique et Amélioration des Espèce Forestières » qui m'a permis d'intégrer cette unité de recherche, ainsi que Letizia CAMUS-KULANDAIVELU et Frédéric BRETON qui m'ont soutenue et épaulée dans mes démarches scientifiques.

Je tiens également à remercier les techniciens de laboratoire, Bénédicte FAVREAU et Alexandre VAILLANT, qui m'ont aidée à me familiariser avec les laboratoires et leurs techniques de biologie moléculaire.

Je remercie également le Laboratoire des Symbiotes Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) qui m'a chaleureusement accueilli dans ses locaux, tout particulièrement Clémence CHAINTREUIL qui a pris le temps de m'enseigner des techniques de clonage.

Enfin je remercie l'ensemble des stagiaires de l'UR 39 : Malyna, Julie, Anthéa et Jonathan avec qui j'ai eu plaisir à travailler et qui m'ont aidée à m'intégrer dans cette équipe.

SOMMAIRE

REMERCIEMENT	i
SOMMAIRE	ii
ABREVIATIONS	iii
LISTE DES FIGURES	iv
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES ANNEXES	vi
I INTRODUCTION	1
1.1. Problématique	
1.2. Objectifs	
1.3. Autres activités de recherche lors de mon stage	
II MATERIELS ET METHODES	3
2.1 Matériel biologique	
2.2 Préparation des Milieux de culture	
2.3 Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur	
2.4 Production de mycélium pour les études moléculaires	
2.5 Extraction de l'ADN fongique à l'aide du kit d'extraction Invitrogen « TM purlink plant total DNA purification kit	
2.6 Quantification des ADN extraits	
2.7 Amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire par PCR	
2.8 Digestion des ITS amplifiés par des enzymes de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) : analyse des profils de restriction	
III RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	9
3.1. Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur	
3.2. Description morphologique de <i>Ganoderma</i> récolté dans les plantations de Tanah- Gambus	
3.3. Extraction de l'ADN fongique à l'aide du kit d'extraction Invitrogen « TM purlink plant total DNA purification kit	
3.4. Amplification de l'ITS	
IV CONCLUSIONS	11
V PERSPECTIVES	11
BIBLIOGRAPHIE	12
ANNEXES	

ABREVIATIONS

UR : Unité de Recherche

CIRAD : Centre International de Recherches Agronomique pour le Développement

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

LSTM : Laboratoire des Symbioses Tropicales Méditerranéennes

WA-CS : milieu Water Agar avec Chloramphénicol et Streptomycine

PDA-C : milieu Potato Dextrose Agar avec Chloramphénicol

M-A : milieu Malt-Agar.

ADN : Acide Désoxyribonucléique

L : Litre.

Ha: hectare

ITS: Internal Transcribed Spacer

LB : milieu Lysogeny broth

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside ($C_{14}H_{15}BrClNO_6$)

IPTG: L'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

PCR : Polymerase Chain Reaction

TBE : Tampon Tris-Borate-EDTA

TAE : tampon Tris-Acétate-EDTA

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organigramme qui présente l'organisation du CIRAD

Figure 2 : L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes

Figure 3 : Le marqueur de poids moléculaires utilisés

Figure 4 & 5 : Mycélium pur de *Ganoderma* pour l'inoculât NJ3

Figure 6 : Développement de filaments mycéliens verts gris : *Penicillium*, *Alternaria tenuis*,...

Figure 7 : Envahissement complet de la boîte : *Mucor bienali*,...

Figure 8 : Carpophores de *Ganoderma* dans les plantations de Tanah-Gambus

Figure 9 : Inoculation de NJ3 sur de l'hévéa

Figure 10 : NJ3 dans les péminières de palmier à huile de Tanah-Gambus

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : liste des échantillons étudiés avec le numéro de l'isolat, le descriptif de l'échantillon (carpophore ou tissus frais), le numéro de la parcelle (Block), le numéro du palmier, l'âge et les symptômes des feuilles.

Tableau 2 : Type et nature de l'agarose utilisé pour les différents gels de contrôle réalisés

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Le clonage de 2 souches de *Ganoderma* de Guyane

Annexe 2 : Tableau du suivi de la mise en culture des échantillons

Annexe 3 : Quantification par spectrophotomètre des 30 échantillons extraits

INTRODUCTION

Le Centre de coopération International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) est un Etablissement Public Industriel et Commercial (EPIC) sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et du ministère des Affaires Etrangères et Européennes. Ce centre de recherche ayant pour but de répondre aux enjeux mondiaux du développement et de l'agronomie avec les pays du Sud, emploie environ 1800 agents dont 800 chercheurs et travaille en partenariat avec plus de 90 pays.

Le CIRAD développe ses activités dans les domaines des sciences du vivant, sociales, et de l'ingénieur appliquées à l'agriculture, à l'alimentation et aux territoires ruraux et divise ses activités en 3 départements scientifiques : Systèmes biologiques (Bios), Performance des systèmes de production et de transformation tropicaux (Persyst), Environnement et sociétés (ES) dont 37 Unités de Recherche (UR).

L'organigramme en Figure 1 présente l'organisation du CIRAD.

Mon travail a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche GFP/AGAP du CIRAD-BIOS. Cette Unité de Recherche du CIRAD-BIOS a pour objectif de mesurer l'impact des processus biotiques, abiotiques induits par l'activité humaine sur l'expression et l'évolution des caractères, et donc sur le comportement des espèces arborées. Elle conçoit des stratégies de gestion de la diversité intra spécifique dans les domaines de l'amélioration génétique, de l'aménagement des espaces forestiers et agroforestiers, de la conservation des espèces menacées et de la restauration des forêts dégradées. Cette Unité de Recherche contribue à l'acquisition des connaissances sur les champignons lignocellulolytiques dans le domaine de l'interaction microorganisme-arbre-environnement afin de mieux comprendre le rôle des facteurs environnementaux dans la prédisposition des arbres aux attaques de pathogènes et le rôle de l'affaiblissement de la plante hôte (arbre) par différents facteurs dans sa colonisation par les microorganismes.

I. INTERET DU PROJET

1.1. Problématique

Ganoderma est un champignon basidiomycète du sol, lignivore et responsable de la pourriture de la base du stipe du palmier à huile. Les dégâts causés par *G. boninense* sont particulièrement importants en Asie du Sud Est, mais il commence également à affecter des palmiers à huile en Afrique centrale et représente une menace pour les plantations d'Amérique latine. *Ganoderma Boninense* est actuellement l'agent pathogène le plus important des palmiers à huile.

(«Rapport de projet GANODIV» Zaremski A., De Franqueville H., Breton F. janvier 2011).

Le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) est une espèce d'intérêt agronomique très importante pour les Pays En voie de Développement (P.E.D) car c'est l'oléagineux le plus productif avec des rendements moyens de 3 à 4 tonnes par hectare, voire 7 tonnes dans les meilleures conditions, à l'instar des autres oléagineux réalisant en moyenne un rendement de 500 L / ha. Le palmier à huile a cette particularité d'être cultivé pour deux de ses huiles : huile le palme (pressage à chaud à partir de la pulpe des fruits) et l'huile de palmiste (pressage à partir des graines du palmier). En 2010, L'Indonésie produisait 22,090 milliers de tonnes d'huile de palme dont les $\frac{3}{4}$ étaient destinés à l'exportation. (*Oil World, Hambourg (Allemagne), et Département de l'agriculture des États-Unis*)

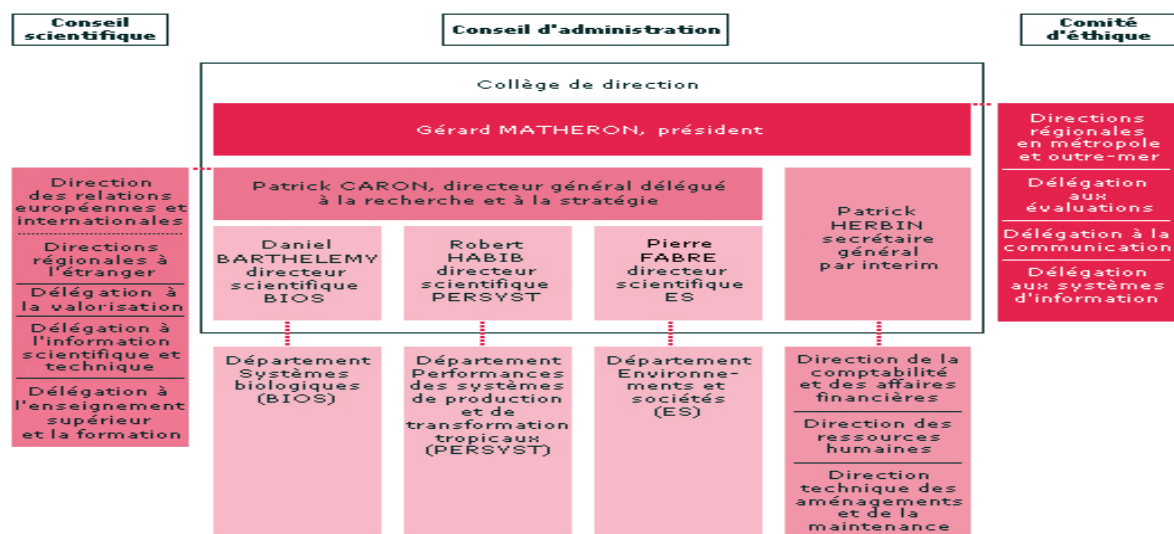


Figure 1. Organigramme qui présente l'organisation du CIRAD

Un des avantages avec ces dérivés du palmier est leur structure glycéridique particulière, en effet, l'huile de palme bien que riche en acide gras saturé, elle se comporte comme une huile riche en acide gras polyinsaturés. C'est une ou plusieurs espèces moléculaires de la fraction insaponifiable qui sont responsables de ce phénomène.

(« L'huile de palme: sa place dans l'alimentation humaine » Graille J., Pina M. Plantations, recherche, développement. Vol.6 n°2 mars-avril 1999:85-90).

Il semble donc important d'effectuer des recherches sur le genre *Ganoderma* et plus particulièrement pour l'espèce *G. boninense* pour mieux contrôler et améliorer la production des dizaines de milliers d'hectares de plantation de palmier à huile à travers le monde.

1.2. Objectifs

Les études entreprises au cours de ce travail ont été menées avec des objectifs multiples:

- appréhender la diversité des fructifications fongiques du genre *Ganoderma* dans les plantations de palmier à huile de Tanah-Gambus, et caractériser cette diversité d'un point de vue taxonomique.
- constituer une collection d'isolats fongiques à partir de ces fructifications fongiques et de tissus frais de palmier à huile infesté par *Ganoderma*.
- caractériser les isolats taxonomiquement.

Mais cette étude ne se limitera pas qu'aux observations morphologiques, histologiques et anatomiques des fructifications qui restent incontournables bien qu'elles consomment beaucoup de temps.

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler dans la région la plus couramment utilisée pour établir l'identification de souches et les arbres phylogénétiques. Les amorces ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') spécifiques des champignons ont été choisis dans le cadre de cette analyse taxonomique des espèces étudiées. Ces amorces ont été dessinées pour amplifier la zone comprenant les espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 relativement variables et la petite sous unité ribosomale 5,8 S peu variable (Gardes et Bruns, 1993 ; Schmidt et Moreth, 2000 ; Martin et al., 2002 ; Guerin-Laguet et al., 2003 ; Mitchell et Zuccaro, 2006). Cette étude devra conduire à l'identification et à la discrimination de la plupart de ces espèces de champignons à partir d'une culture pure mycélienne.

En plus des objectifs précédemment énumérés, cette approche taxinomique devrait aboutir à une meilleure connaissance des champignons qui dégradent les palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense*.

Les principales étapes pour mener à bien cette étude sont les suivantes :

- 1) Isolement en culture pure et production de mycélium pur à partir de carpophores et de tissus frais de palmier à huile infestés.
- 2) Mise au point des techniques de caractérisation moléculaire : extraction et purification de l'ADN du champignon à partir de mycélium pur; mise au point de l'amplification de l'ADN; digestion des ITS amplifiés par des enzymes de restriction.

1.3. Autres activités de recherche lors de mon stage

Au cours des temps d'attente entre les manipulations de mycologie : mise en culture, et obtention de mycélium pur de *Ganoderma* qui ont duré environ 10 semaines, il convient de noter que j'ai eu la charge d'optimiser une méthode d'extraction fongique qui m'a été très utile pour mon étude sur *Ganoderma*.

Ces extractions fongiques ont été réalisées à partir de 27 souches pures de champignons de la collection du CIRAD, tous des basidiomycètes dégradant les bois tropicaux. La quantification et la réalisation de clonage sur 2 de ces 27 souches ont également été effectuées.

Les protocoles de l'extraction fongique de ces 27 souches pures, le clonage ainsi que le tableau représentant les quantités d'ADN obtenues sont présentés dans les chapitres suivants et en Annexe 1.

Remarque : Les essais de clonage étant actuellement encore en cours de réalisation, ces résultats ne sont pas disponibles. Ils le seront début Septembre.

II. MATERIAUX ET METHODES

2.1. Matériel biologique

Dans cette étude, trente échantillons récoltés en mars 2011 dans les plantations de palmier à huile à Tanah-Gambus en Indonésie et stockés au réfrigérateur vont être étudiés. Les échantillons sont présentés dans le tableau 1.

Le matériel biologique est composé de 16 échantillons de tissus frais infestés et de 14 carpophores

2.2. Préparation des Milieux de culture

Les échantillons ont tous été mis en culture dans des boîtes de Pétri, trois milieux de culture différents, à température ambiante (environ 20°C) et à l'obscurité.

Ces trois milieux ont été sélectionnés pour comparer la croissance et la morphologie du mycélium en fonction du milieu :

- WA-CS : (Water-Agar, Chloramphénicol, Streptomycine), inhibe les bactéries et active la croissance du mycélium
- PDA-C : (Potatoe Dextrose Agar, Chloramphénicol) permet l'obtention d'une plus grande quantité de mycélium après récupération du mycélium sur milieu WA-CS
- M-A : (Malt-Agar) permet également l'obtention d'une plus grande quantité de mycélium après récupération du mycélium sur milieu WA-CS

1) milieux WA-CS

- Agar : 25g / L
- Eau distillée : 1 L
- Streptomycine : 0,5g / L
- Chloramphénicol : 0,5 g / L

La streptomycine et le chloramphénicol sont des antibiotiques inhibant la croissance des bactéries présentes sur les tissus frais

Tableau 1. Liste des échantillons étudiés avec le numéro de l'isolat, le descriptif de l'échantillon (carpophore ou tissu frais), le numéro de la parcelle (Block), le numéro du palmier, l'âge et les symptômes des feuilles.

Numéro de l'isolat	Descriptif de l'échantillon	Block	Numéro de palmier	Age (an)	Symptôme des feuilles
D1	carpophore	44	7	15	Important
D2	carpophore	44	7	15	Important
D3	carpophore	44	10	15	Important
D4	carpophore	44	4	15	Important
D5	carpophore	44	4	15	Important
D6	carpophore	44	4	15	Important
D7	carpophore	44	4	15	Important
D8	carpophore/moisissure	53	4	14	Léger
D9	carpophore	44	3	15	Léger
D10	carpophore	53	4	14	Important
D11	carpophore	53	1	14	Léger
D12	carpophore	8	5	8	Important
D13	tissu frais	8	5	8	Important
D14	tissu frais	8	5	8	Important
D15	tissu frais	39	1	13	Important
D16	carpophore	39	16	13	Important
D17	tissu frais	39	16	13	Important
D18	tissu frais	39	8	26	?
D19	tissu frais	39	8	26	?
D20	carpophore/moisissure	57	1	25	?
D21	tissu frais	57	1	25	?
D22	tissu frais	57	7	25	?
D23	tissu frais	57	5	25	?
D24	carpophore/moisissure	62	12	25	Léger
D25	tissu frais	62	10	25	Important
D26	carpophore/moisissure	65	3	23	?
D27	tissu frais	65	3	23	?
D28	tissu frais	42 (pathologie labo)	1	14	Léger
NJ 3	Mycélium pur				
NJ3-H1	Mycélium pur				
NJ3-H2	Mycélium pur				

2) milieux PDA-C

- Extrait de pomme de terre à 4g / L
- Glucose 20g / L
- Agar 15g / L
- Chloramphénicol a 0,5g / L

Note : L'initial D de « PDA » est pour le dextrose, synonyme de glucose lorsqu'il s'agit de D-glucose.

Le glucose et l'amidon présent dans l'extrait de pomme de terre servent de nutriments pour la croissance des champignons, quand à l'antibiotique il sert à inhiber les bactéries.

3) milieux M-A

- 40 g / L de malt
- 20 g / L d'agar.

La haute teneur en hydrates de carbone dans le malt accélère la croissance du champignon le pH acide inhibe la croissance des bactéries. C'est pour cela, en partie, que l'on n'ajoute pas d'antibiotique dans le milieu Malt-Agar

4) Mode opératoire pour la préparation des milieux

Dans un flacon gradué en verre d'1 L on insère les éléments, sauf les antibiotiques, en quantité souhaitée, pour seulement 500 ml.

Le flacon gradué à demi fermé, est alors passé à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C. L'autoclave permet de stériliser le milieu. En effet la vapeur d'eau s'insère dans le flacon et décontamine le milieu présent. D'où le fait de préparer le milieu dans un récipient ayant une contenance double : afin de laisser la vapeur s'immiscer et laisser le milieu pouvoir monter en ébullition.

Après refroidissement du milieu dans un bain-marie de 54°C, on insère les antibiotiques. Il est, en effet, préférable de ne pas les laisser passer à l'autoclave afin qu'il garde un maximum d'efficacité.

On fait ensuite couler environ 20 ml de milieu dans des boîtes de pétri de 10cm de diamètre sous hotte stérile à flux laminaire. Les boîtes de pétris sont laissées à refroidir sous la hotte stérile. Une fois, la gélose refroidie, les boîtes sont prêtes à l'emploi.

2.3. Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur

Sous hotte stérile, on prélève aseptiquement à l'aide d'un scalpel stérilisé dans un stérilisateur à bille, une partie de l'échantillon de tissus frais et/ou de carpophores en 4 morceaux. Deux de ces morceaux sont stérilisés à l'éthanol 70 %. En effet le fait de stériliser en surface les morceaux permet d'enlever une partie des bactéries présentes. Mais, par précaution, les deux autres morceaux ne sont pas stérilisés afin de ne pas tuer toute la flore fongique. Quatre boîtes de Pétri contenant le milieu WA-CS sont donc utilisées par échantillon. Au total 120 boîtes seront utilisées dans cette première étape d'isolement.

Les cultures sont laissées à incuber à l'obscurité et à une température de 20°C, en ne les amenant à la lumière que pour les examiner.

Elles sont examinées tous les jours pendant 4 semaines (phase active du mycélium). Les examens et l'identification de ces isoléments sont réalisés sous la loupe et au microscope optique soit directement dans les boîtes de Pétri ou à l'aide de préparations particulières entre lame et lamelle (au Lugol, au bleu Cotton).

Après avoir obtenu un mycélium recouvrant une partie de la plage de milieu de culture WA-CS, et étant morphologiquement du basidiomycète *Ganoderma* qui a un mycélium blanc, lisse et ras, l'isolement peut se réaliser sur les milieux M-A et PDA-C.

Les cultures sont laissées de nouveau à incuber à l'obscurité et à une température de 20°C, en ne les amenant à la lumière que pour les examiner. Elles sont examinées tous deux jours pendant 6 semaines

Pour chaque échantillon, quatre boîtes de Pétri sont utilisées pour avoir une meilleure chance de réussite pour le repiquage. Et à partir d'une culture en pleine croissance, des repiquages sont réalisés à partir de cubes de 2-3 mm d'arête. Les cultures sont laissées à incuber à l'obscurité et à une température de 20°C. Une surveillance quotidienne est réalisée. A chaque fois qu'il apparaît un développement du mycélium, il faut le repiquer, afin de l'isoler des autres champignons susceptibles de se développer après.

Lorsque la pureté du mycélium est observée, celui-ci est repiqué sur 4 boîtes de Pétri de Malt-Agar puis définitivement entretenue dans deux tubes au réfrigérateur et à l'obscurité.

2.4. Production de mycélium pour les études moléculaires

Pour chaque souche pure, le mycélium est cultivé en boîte de Petri sur milieu de culture malt-agar (4%-2%) recouvert d'une feuille de cellophane (Lecellier et Silar, 1994). Après 10 jours de culture à 20°C à l'obscurité, le mycélium est récolté en prenant soin d'éliminer toute trace de milieu de culture, notamment la gélose de l'implant de repiquage. On dispose d'une méthode qui permet d'obtenir un mycélium dépourvu de toute trace de milieu de culture, notamment de gélose. Avant de procéder à l'étape de purification de l'ADN nucléaire, les mycéliums récoltés sont placés dans un tube Eppendorf, congelés dans l'azote liquide puis stockés au congélateur à -80°C. Dans ces conditions, la conservation peut-être envisagée pendant une durée, de l'ordre de quelques années.

2.5. Extraction de l'ADN fongique à l'aide du kit d'extraction Invitrogen « TM purlink plant total DNA purification kit »

Sous hotte stérile, à l'aide d'un scalpel et d'une pince stériles, ôter le mycélium de la gélose. Le placer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml stérile.

Mettre le tube dans de l'azote liquide pendant 2 mn

Ajouter 500 µL de tampon de suspension R2 du kit InvitroGen.

Note : le kit n'en préconise que 250 µL, nous avons doublé la quantité pour que le mycélium soit bien immergé dans le tampon.

Broyer manuellement le mycélium à l'aide d'un pilon stérile dans le tube Eppendorf.

Cette étape réalisée, le protocole utilisé pour l'extraction de l'ADN fongique est réalisé avec un kit d'extraction d'InvitrogenTM purlinkTM plant total DNA purification kit.

Les étapes pour la préparation du lysat végétal sont les suivantes :

- Ajouter 250µl de tampon de suspension (R2) qui est à température ambiante.
- Homogénéiser la solution au vortex.
- Ajouter 15 µl de SDS 20% et 15 µl de RNase A (20mg/ml) pour obtenir le lysat.
- Incuber à 55°C pendant 15 minutes pour compléter la lyse.
- Centrifuger le lysat à 10000 rpm pendant 5 minutes pour éliminer le matériel insoluble.
- Transférer le surnageant dans un tube stérile de 1,5ml sans remuer le culot.
- Ajouter 100µl de tampon de précipitation (N2) dans le lysat. Mélanger au vortex et incuber dans de la glace pendant 5 minutes.
Cette étape permet de précipiter les protéines et les polysaccharides et tous les pigments photosynthétiques liés aux protéines sont également précipités. Les pigments peuvent tâcher les cartouches Purelink™ et donner un éluat coloré.
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante pour avoir un lysat clair. Note : le surnageant doit être clair et non visqueux après cette étape de précipitation.
- Transférer 250µl du lysat dans un tube stérile de 1,5 ml et ajouter au lysat 375µl de tampon de liaison (B4) contenant de l'éthanol. Bien mélanger au vortex.

Procéder à la fixation de l'ADN :

- Transvaser la solution dans une colonne du kit Invitrogen mise sur un tube 2ml fourni dans le kit et centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante.
- Jeter le tube 2 ml avec le filtrat et placer la colonne sur un tube 2 ml propre fourni dans le kit.

Lavage de l'ADN :

- Ajouter dans la colonne 500 µl de tampon de lavage (W4)
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante. Enlever le filtrat et remettre la colonne dans le tube 2 ml.
- Ajouter dans la colonne 500 µl de tampon de lavage (W5) contenant de l'éthanol.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante. Enlever le filtrat et remettre la colonne dans le tube 2ml.
- Répéter les étapes 3 et 4 une fois de plus.
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 2 minutes pour éliminer tout résidu de tampon de lavage (W5) à température ambiante. Jeter le tube 2 ml.

Procéder à l'élution de l'ADN.

- Placer la colonne dans un tube stérile 1,5 ml.
- Ajouter 100 µl de tampon d'élution (E1) ou de l'eau distillé (pH>7).
- Incuber à température ambiante pendant 1 minute puis centrifuger à 15000 rpm pendant 1 minute. Le tube contient alors l'ADN purifié.
- *En option : pour récupérer plus d'ADN, réaliser une deuxième étape d'élution en utilisant 100 µl de tampon d'élution (E1) ou de l'eau distillée. La deuxième élution peut être effectuée en utilisant le même tube d'élution ou dans un tube différent.*
- Centrifuger la colonne à 15000 rpm pendant 1 minute à température ambiante.

Le tube contient alors l'ADN purifié. Retirer et jeter la colonne.

Les tubes sont ensuite conservés au congélateur à -20°C pour éviter toute dégradation de l'ADN.

2.6. Quantification des ADN extraits

L'ADN des souches extraites est quantifié par spectrométrie sur le spectrophotomètre Shimadzu. Il mesure la concentration et la pureté de l'ADN extrait avec 2µl d'échantillon.

L'indice de pureté est calculé grâce aux rapports des mesures de l'absorbance à 260 et 280 nm. Ce rapport 260/280 doit se rapprocher de 1,8 pour qualifier l'échantillon de pur. Des valeurs plus petites indiqueraient la présence d'impuretés ou de protéines absorbant aux environs des mêmes longueurs d'ondes

2.7. Amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Un protocole d'amplification adapté aux champignons mycorrhiziens, inspiré par White *et al.* (1990) et mis au point au Laboratoire des Symbiotes des Racines (INRA de Montpellier) a été utilisé.

Les champignons, qui sont des organismes eucaryotes, ne possèdent pas les mêmes ARN ribosomiques que les bactéries qui sont des organismes procaryotes. Ils doivent donc être analysés séparément. Or, l'étude de la diversité par biologie moléculaire est moins répandue chez les eucaryotes, en particulier au niveau des champignons. Le choix des amorces et donc du gène cible à amplifier pour identifier les champignons d'un échantillon environnemental est encore discuté. Cependant l'étude de la région de l'ADN codant pour les sous-unités ribosomiques est aujourd'hui établie. La figure 1 montre de façon schématique l'opéron ribosomique avec les sites des différentes amorces utilisées ou utilisables pour l'étude de l'ADN ribosomique nucléaire.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans des plaques propres de PCR. Le volume réactionnel est le suivante : 4 µl de dNTP ; 10 µl tampon 5X ; 2 µl de chaque amorce (20pmol/µl) : ITS1-myc et ITS4-myc ; 5 µl ADN total extrait (environ 50ng) ; 26,8 µl eau millipore ou stérile (pour compléter à 50µl); 0,3 µl Taq polymérase.

Des témoins sans ADN sont réalisés pour tester la présence d'éventuelles contaminations dans les réactifs et dans les tampons.

Les 50µl du mélange sont ensuite recouverts d'1 goutte d'huile minérale pour éviter les phénomènes d'évaporation et de condensation dans les tubes. La plaque est ensuite recouverte d'un papier adhésif et placée dans un thermocycleur programmé de la façon suivante :

- une phase initiale de dénaturation à 96°C pendant 5 min.
- 30 cycles comprenant une phase de dénaturation à 96°C pendant 30 sec, une phase d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes. Puis une phase d'extension à 72°C pendant 1.30min
- allongement de la phase d'extension ou phase finale d'élongation à 72°C pendant 7 min
- conservation du produit d'amplification à 4°C avant congélation à -20°C

Ce protocole permet d'amplifier correctement la région qui nous intéresse; il est toutefois nécessaire de rechercher la concentration en ADN qui permet d'obtenir une réaction d'amplification optimale.

La vérification du bon fonctionnement de la réaction d'amplification est réalisée grâce à la visualisation des amplifiats sur un gel de contrôle. Dix µl d'amplifiats sont déposés sur un gel d'agarose à 0.8% dans un tampon TAE 1X. La migration s'effectue par électrophorèse à 120V pendant une heure.

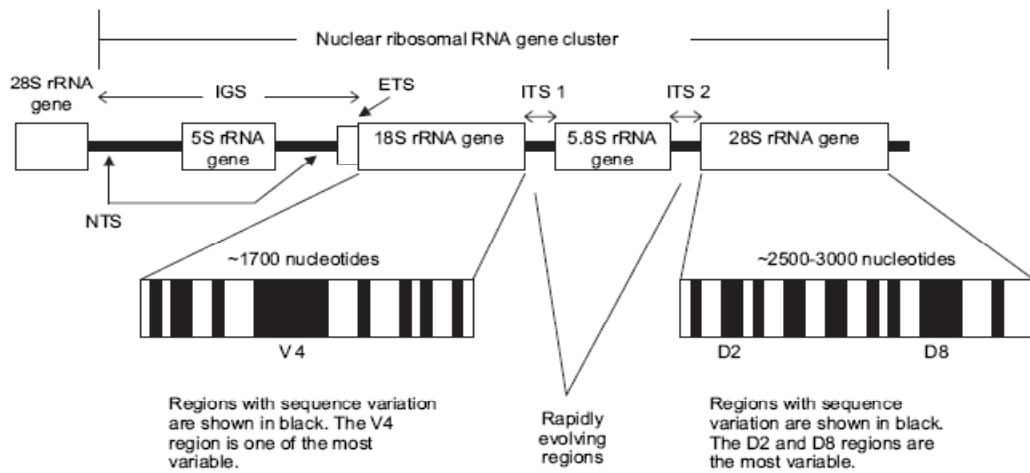


Figure 2. L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes. L'opéron comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5.8S, 18S et 25S ou 28S), et des régions « entre-espaces » entremêlées (IGS – intergenic spacer, NTS – non-transcribed spacer, ETS – externa

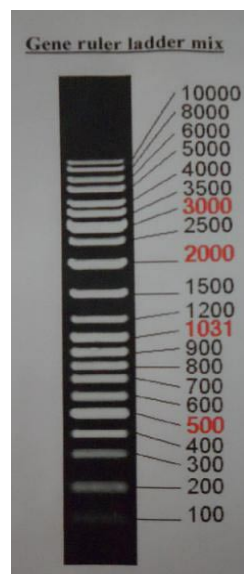


Figure 3. Le marqueur de poids moléculaires utilisés

La longueur des fragments amplifiés (npb : nombre de paires de bases) a été estimée par la distance de migration de chaque fragment par rapport au marqueur de poids moléculaires de Fermentas : Gene Ruler DNA Ladder Mix (0,5mgDNA/ml à 0,05mg).

2.8 Digestion des ITS amplifiés par des enzymes de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) : analyse des profils de restriction

Le protocole de digestion est utilisé avec les trois enzymes suivantes : AluI (5'AG[^]CT3'), TaqI (5'T[^]CGA3'), et Sau96 (5'G[^]GNCC3') choisies suite à une étude pour leur potentiel discriminant c'est-à-dire pour leur aptitude à mettre en évidence une certaine diversité au sein du groupe des champignons basidiomycètes (Zaremski, 1999).

Note : N : A ou C ou T ou G

[^] : Site de coupure des enzymes

Les réactions de digestion des ITS sont réalisées avec 10 µl d'amplifiat (produits de PCR) et 20 µl d'un mélange de 17 µl H₂O ultra pure, 2 µl d'un tampon correspondant à l'enzyme et 1µl d'enzyme.

Ces réactions sont réalisées :

- à 37°C pendant 15minutes avec l'enzyme AluI (5'AG[^]CT3'),
- à 37°C pendant 5minutes avec l'enzyme Sau96 (5'G[^]GNCC3')
- à 65°C pendant 5minutes avec l'enzyme TaqI (5'T[^]CGA3').

Les dépôts dans les puits des différents gels ont été réalisés avec 15 µl d'un mélange composé de 15 µl des produits de digestion de l'ADN amplifié et 5 µl de tampon de charge « 6XDNA loading » (bleu de bromophénol, glycérol 87%, EDTA 0,5M, xylène cyanol FF). Les marqueurs de poids moléculaire sont placés de part et d'autre du gel afin d'estimer le nombre de paires de base des fragments obtenus.

L'ADN obtenu est visualisé sous UV après électrophorèse en gel d'agarose révélé dans un bain qui contient du bromure d'éthidium (BET) à 2 µg.ml⁻¹.

Les gels de contrôle sont réalisés dans du TBE 1X avec différents types d'agarose et différentes conditions de migration suivant les cas et présentés dans le chapitre 2.8. « Gels de contrôle ».

Des dilutions de concentration d'ADN ont été effectuées au 10^{ème}, 100^{ème} et 1000^{ème}.

2.9 Gels de contrôle

Pour chacune des étapes décrites : purification de l'ADN, amplification de l'ITS et digestion de l'ITS par différentes enzymes de restriction, l'ADN obtenu est visualisé en lumière ultra-violette après électrophorèse en gel d'agarose et révélation dans le bromure d'éthidium (BET) à 2 µg.ml⁻¹. Les gels de contrôle sont réalisés dans du TBE 1X ou du TAE 1X, avec différents types d'agarose et différentes conditions de migration suivant les cas (tableau 2).

Tableau 2. Type et nature de l'agarose utilisé, étapes concernées et conditions de migration des différents gels de contrôle réalisés.

Types et différentes concentrations d'agarose	Etapes concernées	Conditions de migration
Agarose 0,8% dans du TAE1X	Purification de l'ADN, PCR de l'ITS	120V, 30 min.
Agarose 2%	Evaluation npb de l'ITS	70V, 4 h
Agarose 0,8% + Nusieve 2,2% Dans du TBE 1X	Digestions des ITS	70V, 4 h

npb : nombre de paires de bases

III RESULTATS

3.1. Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur

La liste des échantillons fongiques étudiés dans l'étude figure dans l'annexe 2. Cette liste présente la référence des isolats, l'origine du substrat, la date de prélèvement et le nombre de repiquage qu'il a fallu pour l'obtention de la souche pure.

Le mycélium attendu de *Ganoderma* sur le milieu de culture est le développement de filaments mycéliens blancs serrés et fins, et légèrement à bords brun orangés (Figure 4).

La recherche d'un milieu de culture favorable à la croissance de mycélium s'est avérée nécessaire notamment pour la plupart des échantillons qui montraient des difficultés à croître sur le milieu M.A (Malt Agar), classiquement utilisé au laboratoire. C'est le milieu P.D.A (Malt Dextrose Agar) contenant l'antibiotique streptomycine qui a été retenu.

Cependant, de nombreuses contaminations dans les boîtes de Pétri ont été rencontrées lors de l'isolement. Elles sont causées principalement par la présence de bactéries, de moisissures, d'insectes et d'acariens venant des échantillons. Les contaminants se développent en général en colonies ou en mycélium irradiant le milieu. Souvent, les contaminants suivent l'évolution du mycélium et résistent bien aux antibiotiques. Les insectes et les acariens apportent souvent les moisissures et l'isolement est difficile à obtenir dans ces cas là.

Dans ce contexte un nombre important de contaminations a été observé lors des isolements et des repiquages successifs de ces souches ont été effectuées avant l'obtention d'une souche pure : sur les 30 échantillons présentés dans l'annexe 2, cinq échantillons ont donné un mycélium pur de champignon qui sont en cours d'identification (anatomie, morphologie, et caractérisation moléculaire).

Les principaux contaminants** observés par Madame Zaremski montrent des aspects morphologiques différents sur les milieux de culture:

- milieu de culture envahi de bactéries et de levures : développement gluant, lisse, jaune ou blanc
- développement gluant de coloration rose : *Rhodotorula* sp.
- Léger développement de filaments mycéliens blancs fins floconneux : *Trichoderma* sp.
- Développement de filaments mycéliens de coloration gris noir floconneux : *Botrytis cinerea*
- Développement de filaments mycéliens verts gris : *Penicillium*, *Alternaria tenuis*
- Développement de filaments mycéliens verts foncés : *Alternaria*, *Trichoderma*
- Important développement de filaments mycéliens pourpres avec rougissement du milieu : *Epicoccum purpurescens*, *E.nigrum*, ou *Fusarium* (revers orange)
- Filaments mycéliens blancs rosés à bords noirs : Noir charbon : *Aureobasidium pullulans*
- Développement de filaments mycéliens blancs grisâtres ou d'un monticule de coloration noire : *Cladosporium herbarum*
- Développement blanc sur le bois et la boîte est complètement envahie par *Mucor Bieneniae* (strie étoile)

**Note : Pour une caractérisation certaine et fiable de tous ces contaminants, il faudrait bien entendu les identifier selon les méthodes de la systématique classique qui n'est pas le propos dans notre étude

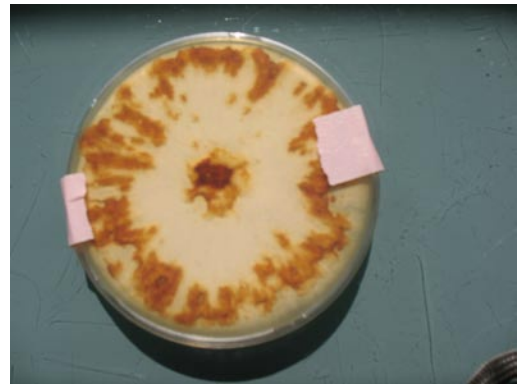
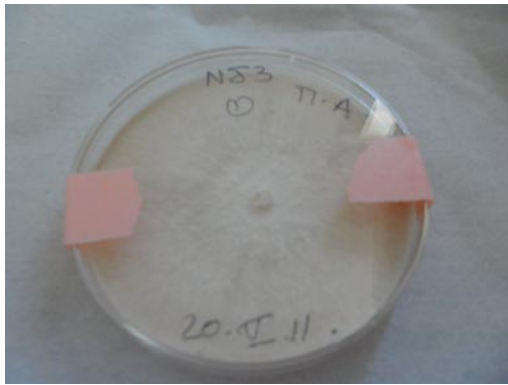


Figure 4 et 5. Obtention de mycélium pur de Ganoderma pour l'inoculât NJ3

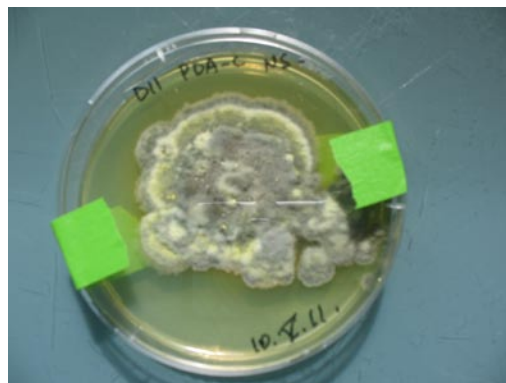


Figure 6. Développement de filaments mycéliens verts gris : *Penicillium*, *Alternaria tenuis*,....



Figure 7. Envahissement complet de la boîte : *Mucor bienalis*,...

Il est apparu que ces isollements doivent se faire impérativement dans les 24 heures qui suivent la récolte dans les plantations sinon les échantillons, en particulier les tissus frais de palmier à huile se décomposent très vite.

Il semble que ce mode d'isolement ne soit pas adapté à ces champignons. L'exploration d'autres techniques d'isolement seront envisagées pour ce type d'isolement (préparations d'autres milieux, ajouts d'autres antibiotiques, d'anti acariens dans les milieux de culture, ...).

3.2. Description morphologique de *Ganoderma* récolté dans les plantations de Tanah-Gambus

C'est une espèce porée et la trame est colorée. *Ganoderma* est représenté par différentes formes souvent en forme de console semi-circulaires à zones concentriques et est largement fixé au substrat : palmier à huile. Les formes diffèrent entre elles par la longueur ou l'absence du stipe, par l'épaisseur de celui-ci, par la forme et l'épaisseur du chapeau. Le chapeau peut varier de 50 à 200 mm de largeur. Cela peut ressembler à une petite cuiller au bout d'un long manche filiforme, ou au contraire s'épater largement au ras du sol. Ils ont un vernis caractéristique et de belles couleurs brillantes allant de l'orange vif au brun rouille. La marge est en général rouge brique à bord clair orangé. L'hyménium ou couche sporifère est sans cystides. La chair, ou trame, du carpophore est colorée et ligneuse.

3.3. Etudes moléculaires

Pour les études moléculaires, j'ai travaillé sur les trois mycéliums purs de *Ganoderma* que nous avons obtenus après 10 semaines d'isolement : NJ3, NJ3-H1 et NJ3-H2. Ces souches servent à inoculer les éprouvettes d'hévéa pour les études de résistance au *Ganoderma* dans les pépinières de palmier à huile de Tanah-Gambus en Indonésie (Figure 8).

Les études moléculaires concernant l'amplification et la RFLP sont actuellement encore en cours de réalisation. Les résultats ne seront disponibles que vers fin Juillet.

3.3.1. Extraction et Purification de l'ADN

Au total, nous avons effectué 30 extractions et purifications d'ADN à l'aide du kit Invitrogen : 27 souches pures de champignons basidiomycètes dégradant les bois tropicaux.

L'adaptation du protocole du kit Invitrogen et mis en place au laboratoire a permis une extraction optimale. Ainsi l'ADN des 27 souches purs de champignons basidiomycètes dégradant les bois tropicaux et des 3 NJ3 (NJ3-mycélium pur ; et 2 à partir de NJ3 dans les éprouvettes d'hévéa : NJ3-H1 et NJ3-H2) étudiés a pu être extrait et amplifiés.

La concentration et la pureté des ADN totaux extraits ont été évaluées. Les quantités d'ADN obtenues varient en fonction des échantillons : de 12 à 7141ng/ml et sont présentés dans le tableau 3. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'obtention d'impuretés qui « biaiserait » les mesures effectuées au spectrophotomètre. Dans ce dernier cas, une étape supplémentaire concernant le lavage du culot, lors de l'extraction de l'ADN, peut être envisagée.



Figure 8. Carpophores de Ganoderma dans les plantations de Tanah-Gambus



Figure 9. Inoculation de NJ3 sur de l'hévéa



Figure 10. NJ3 dans les pépinières de palmier à huile de Tanah-Gambus

IV. CONCLUSION

Les méthodes descriptives utilisées pour la caractérisation nécessaire à l'identification des champignons se basent sur des caractères morphologiques et anatomiques des basidiomes (Bon, 1988, Andary *et al.*, 1991, Courtecuisse et Duhem, 1994). La description des basidiomes est utilisée pour des identifications au niveau intergénérique et interspécifique.

Ces méthodes classiques basées sur la description de caractères morphologiques des champignons demeurent incontournables. Cependant, ces méthodes possèdent des limites pour la caractérisation et l'identification de ces champignons, au niveau inter et intraspécifique. Elles ne permettent pas toujours l'identification avec certitude et facilité des cultures mycéliennes de certaines espèces ; elles restent fastidieuses. Il faut compter environ dix semaines pour l'obtention d'un mycélium pur de *Ganoderma*.

L'adaptation du protocole du kit Invitrogen et mis en place au laboratoire a permis une extraction optimale. Ainsi l'ADN des 27 souches purs de champignons basidiomycètes dégradant les bois tropicaux et des 3 NJ3 (NJ3-mycélium pur ; et 2 à partir de NJ3 dans les éprouvettes d'hévéa : NJ3-H1 et NJ3-H2) étudiés a pu être extrait et amplifié.

V. PERSPECTIVES

La méthode développée dans ce travail sera étendue à l'ensemble de la collection des *Ganoderma* du laboratoire afin de constituer une banque de données de profils de restriction des champignons associés au phénomène de dépérissement du palmier à huile. Une telle banque de données est nécessaire au développement d'une méthode de détection précoce et à une identification précise de ces champignons directement dans les tissus de palmier à huile et permettra également de recommander les traitements adaptés pour une meilleure gestion phytosanitaire des plantations de palmier à huile.

Il sera également intéressant lorsque seront élaborées les banques de profils de restriction de procéder au suivi des souches de références des pépinières de palmier à huile. Ainsi, la qualité, la stabilité génétique, notamment en ce qui concerne la virulence des souches de référence, pourront être contrôlées. Cela permettra également de réaliser une bonne gestion et une bonne conservation des souches de *Ganoderma* de la collection du CIRAD.

J'ai pu, durant ce stage, mettre en pratique régulièrement les techniques de génie génétique exploitées en TP cette année, et me familiariser plus assidument avec le vocabulaire et les techniques de laboratoire de biologie moléculaire.

Au jour d'aujourd'hui, j'ai pour projet professionnel de travailler dans l'agrodéveloppement, plus particulièrement dans le développement agricole des P.E.D. Ce stage m'a permis de voir concrètement les démarches et tous les aspects économique, sociologique, écologique, de gestion et de travail d'équipe à prendre en compte pour mener à bien un projet de développement.

BIBLIOGRAPHIE

Ouvrages

Andary C., Courtecuisse R. et Bourrier M.J. 1991. Atlas microphotographique pour l'expertise et le contrôle des champignons comestibles et leurs falsifications. Montpellier, EUROMEDIA, 547 p.

Articles de publications scientifiques

Stalpers J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Stud. Mycol. Centraalb. Schimmelcult. Baarn 16:1-248.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : PCR Protocols. A guide to methods and applications, Edition Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ Academic press, San Diego, USA, p. 315-322.

Gardes M., Muller G.M., Fortin J.A. et Kropp B.R. 1991. Mitochondrial DNA polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. Mycol. Res. **95**:206-216.

Gardes M. et Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:113-118.

Lecellier G, Silar P (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. Current Genetics 25: 122-123.

1999. L'huile de palme : sa place dans l'alimentation humaine. Plantation, recherche et développement, vol. 2, n°2, pp 85 – 90.

Zaremski A., Ducousso M., Prin Y. et Fouquet D. 1998. Characterization of tropical wood-decaying fungi by RFLP analysis of PCR amplified rDNA. Int. Res. Group, Wood Preserv. Doc. N°. IRG/WP/10251, 10 p.

Jasalavich, C.A., Ostropskyand, A., and Jellison, J. 2000. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified gene encoding rDNA. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 4725-4734.

Moreth, U., and Schmidt, O. 2000. Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. Holzforschung **54**: 1-8.

Hibbett, D.S., and Donoghue, M.J. 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. Syst. Biol. **50**: 215-242.

Schmidt, O., Grimm, K., and Moreth, U. 2002. Molecular identity of species and isolates of the *Coniophora* cellar fungi. Holzforschung **56**: 563-571.

Martin, F., Diez, J., Dell, B., and Delaruelle, C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* **153**: 345-357.

Guerin-Laguette, A., Conventi, S., Ruiz, G., Plassard, C., and Mousain, D. 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* **13**: 17-25.

Selosse M.A. et Durrieu G. 2004. Une classification mycologique phylogénétique francophone (en 2003). *Acta Bot. Gallica.* **151**: 73-102.

Mitchell J. I. and Zuccaro A. 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, 20 (2): 62-74.

Rapport de stage

Montembault S., 1995. Etude par PCR-RFLP de la diversité de l'ADN ribosomal nucléaire d'isolats de quatre espèces ectomycorhiziennes associées aux pins (*Lactarius sanguifluus*, *Lactarius semi-sanguifluus*, *Lactarius deliciosus* et *Lactarius salmonicolor*). Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Montpellier II, France, 26p.

Rapport d'étude

Breton F., Franqueville H., Zaremski A., 2001. Rapport du projet Ganodiv, Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et identification précoce des champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense*.

Site internet

<http://www.molecularstation.com/>

ANNEXE 1 : Le clonage de 2 souches de *Ganoderma* de Guyane

Le clonage des gènes, de fragments de gènes et autres séquences d'ADN est un élément fondamental de la biologie moléculaire. Pour étudier la fonction d'une séquence d'ADN particulière, on doit être capable de manipuler cette séquence.

Une région du génome nommée ITS permet de caractériser inter-spécifiquement la diversité fongique. Des échantillons d'autres séries importés pour le même projet, ont été amplifiés par PCR dans cette région par les amorces ITS1 et ITS4.

Un clonage a été réalisé sur ces régions afin d'obtenir des séquences « propres ».
Le clonage a été réalisé dans les laboratoires du LSTM grâce au kit de clonage Wizzard

1) Ligation

Dans un tube eppendorf on dépose:

5 µl (2xLig buff Tp (2x)

1 µl vecteur pGEMT

3 µl Produit PCR

1 µl Ligase

On passe au vortex au et culotte par un bref passage à la centrifugeuse.

On laisse alors le produit dans un bain marie à 16°C.

2) Transformation

Dans un tube Eppendorf mettre :

5 µl de produit de ligation (ci-dessus)

Ajouter 50 µl de cellules chimio compétentes XL2

Incuber 30 mn dans la glace 4°C

Sécher les tubes et les plonger 35 secondes à 42 °C

Remettre 2 mn dans la glace, ces étapes permettent de lyser les cellules par choc thermique.

Sous la hotte à flux laminaire, ajouter 150 µl de Soc

Agiter 2 h à 37°C sur roue tournante

On étale, à l'aide des billes, sur boîte de Pétri, 150 µl de milieu LB + 150µl d'antibiotique Ampiciline + 40µl Xgal + 40µl IPTG.

On laisse incuber toute une nuit à l'étuve à 37°C, afin de laisser les clones former des colonies.

On peut alors observer des colonies de clones «blancs» et des colonies de clones «bleus». Les colonies «blanches» sont celles qui ont reçu le plasmide contenant l'insert, elles sont restées blanches car la β-Gal n'a pas catalysé la X-Gal. L'insertion du fragment fait que la β-galactosidase n'est plus fonctionnelle.

Les clones «blancs » sont choisis au hasard pour chacune des transformations réalisées. Dans un tube Eppendorf contenant 50 µl d'eau ultrapure, on ajoute à l'aide de cure dent une légère

culture d'un clone blanc, on homogénéise et procède à l'éclatement des cellules afin de libérer l'ADN.

Cependant pour des études plus poussées, l'ADN plasmidique est purifié à partir des clones blancs. Pour cela, le protocole d'extraction plasmidique du kit « DNA Purification System » Wizard Plus SV minipreps est appliqué suivant les instructions du fournisseur.

- Centrifuger les tubes de culture à 4000 rpm pendant 10 minutes
- Jeter le surnageant et laisse sécher des tubes (retournés) sur du papier filtre pour éliminer le reste du milieu.
- Récupérer le culot par XX µl de solution de suspension cellulaire CRA. Cette solution comprend 50 mM tris-HCl (pH 7,5), 10 mM d'EDTA, 100 µg/ml RNase A).
- Déposer le culot dans un tube eppendorf.
- Ajouter 250 µl de solution de lyse cellulaire CLA contenant 0,2 M NaOH avec 1% SDS.
- Mélanger par retournement 4 fois et on laisse incubé 5 min.

On ajoute 10 µl sz solution protéinase K alcalin et on mélange par retournement 4 fois

- Laisser incubé 5 minutes a température ambiante (la protéinase K désactives les endonucléases et les protéines libérées lors de la lyse des cellules bactériennes).
- Ajouter 350 µl de solution NSB de neutralisation contenant 4,09M de guanidine hydrochloride, 0,759M de potassium acetate et 2,12M glacial acetic acid)
- Mélanger immédiatement par retournement du tube 4 fois.
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 10 mins.
- Récupérer le surnageant dans un tube + colonne-filtre (appelée aussi nacell-filtre)
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 2 mns

ANNEXE 2 : Tableau du suivi de la mise en culture des échantillons

Référence de l'échantillon	Nature	Mise en culture	Obs. Du 12.IV.11	1 ^{er} repicage	Obs. du 20.IV.11	2 ^{ème} repicage 25.IV.11	Obs du 2.V.11	3 ^{ème} repicage 4.V.11	Obs du 11.V.11	4 ^{ème} repicage 13.V.11	Obs du 20.V.11	5 ^{ème} repicage 23.V.11	LE 9.V.11
D 1	carpophore	5.IV.11	Contaminations : 1 / 4	14.IV.11	Conta. : totales								
D 2	carpophore	5.IV.11	Conta. : 2 / 4	14.IV.11	Conta. : totales								
D 3	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 4	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 5	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X		X	Non basid.				
D 6	carpophore	5.IV.11	Conta. : 1 / 4	14.IV.11	Conta. : 3 / 4	X		X	Non basid.				
D 7	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 8	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X		X	Non basid.				
D 9	carpophore	5.IV.2011		14.IV.11	Conta. : 1 / 4	X		X	Non basid.				
D 10	carpophore	5.IV.2011		14.IV.11		X		X	Non basid.				
D 11	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 12	carpophore	6.IV.11		14.IV.11	Conta. : 2 / 4	X	Non basid.						
D 13	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X		X		X	Non basid.		
D 14	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X	Conta. 2/4	X		X	Non basid.		
D 15	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X		X		X	Non basid.		
D 16	carpophore	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 17	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 18	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X	Semble être du Gano.	X		X		X	Obtention de mycélium de Gano. pur
D 19	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	contas.: 1/4	X		X		X	Non basid.		
D 21	carpophore	6.IV.11		14.IV.11		X		X		X	Semble être du Gano.	X	IDEM
D 22	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X	Semble être du Gano.	X		X		X	IDEM
D 23	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	Contas.:2/4	X					Semble être du Gano.	X	IDEM
D 24	carpophore	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 25	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 26	carpophore	6.IV.11		14.IV.11		X	Conta. 1/4	X		X			
D 27	Tronc de palmier	6.IV.11	Conta. : 1/4	14.IV.11	Contas.: 1/4	X	Semble être du Gano.	X		X	Semble être du Gano	X	
D 28		6.IV.11	01-avr	14.IV.11	Contas.:2/4	X							

ANNEXE 3 : Quantification par spectrophotomètre des 30 échantillons extraits

N° Référence	Genre et espèce	A1	A1/A2	A1/A3	Concentration ng/μl
1	<i>Pnycoporellus fulgeus</i>	0.0464	1.701	1.049	20.9
2	<i>Pnycoporellus fulgeus</i>	0.0133	1.321	0.326	4272.5
3	<i>Ganoderma weberianus</i>	0.0139	1.361	0.106	2990.7
4	<i>Pnycoporellus fulgeus</i>	0.0574	1.497	0.394	14.43
5	<i>Antrodia albobrunnea</i>	0.0300	1.345	0.466	7141.1
6	<i>Tyromyces aortie</i>	0.0465	1.367	0.283	12.3
7	<i>Antrodia albida</i>	0.0160	1.326	0.205	3479
8	<i>Poria albipellicula</i>	0.0151	1.411	0.446	4821.8
9	<i>Poria albipellicula</i>	0.0048	1.350	0.243	1647.9
10	<i>Poria albipellicula</i>	0.0099	1.222	0.198	2685.5
11	<i>Poria albipellicula</i>	0.0231	1.829	0.377	4577.6
12	<i>Fomitopsis palustris</i>	0.0670	1.339	0.365	14.2
13	<i>Fomitopsis palustris</i>	0.0052	1.000	0.179	1159.7
14	<i>Fomitopsis palustris</i>	0.0144	1.109	0.242	3112.8
15	<i>Fomitopsis palustris</i>	0.0277	1.829	0.139	3906.3
16	<i>Poria byssina</i>	0.0181	1.404	0.167	4028.3
17	<i>Poria byssina</i>	0.0149	1.256	0.355	2990.7
18	<i>Ganoderma atkensonii</i>	0.0258	1.640	0.475	13.6
19	<i>Ganoderma atkensonii</i>	0.0006	0	0.046	indéterminé
20	<i>Ganoderma atkensonii</i>	0.0161	1.449	0.257	4333.5
21	<i>Antrodia malicola</i>	0.0155	1.456	0.259	5065.9
22	<i>Antrodia malicola</i>	0.0244	1.472	0.279	4760.7
23	<i>Tyromyces aortie</i>	0.0116	1.382	0.270	2868.7
24	<i>Tyromyces aortie</i>	0.0253	1.467	0.235	6713.9
25	<i>Poria taxicola</i>	0.0753	2.049	0.610	indéterminé
26	<i>Poria taxicola</i>	0.0256	1.263	0.324	6164.6
27	<i>Antrodiella overholtsii</i>	0.0266	1.273	0.264	5127
NJ3	<i>Ganoderma Boninense</i>	0.0043	1.036	0.202	3479
NJ3-H1	<i>Ganoderma Boninense</i>	0,0115	0	0	indéterminé
NJ3-H2	<i>Ganoderma Boninense</i>	0,0505	1,425	0,488	15.6

RESUME

Le genre *Ganoderma*, de la famille des basidiomycètes est notamment connu pour être des champignons telluriques pourridiés du bois. Il existe différentes espèces de *Ganoderma* tels que *Ganoderma Australe*, *Ganoderma Mastoporum*, *Ganoderma Lucidum*, *Ganoderma aff. Steyaertam*, *Ganoderma carnosum*, etc... L'espèce *Ganoderma boninense* est reconnue pour être la plus impliquée dans le phénomène de dépérissement du palmier à huile.

Le genre et l'espèce *Ganoderma boninense*, basidiomycète, est notamment reconnu pour son implication au phénomène de dépérissement des palmiers à huile. Cependant, il existe une grande diversité dans le genre *Ganoderma* tels que *Ganoderma Australe*, *Ganoderma Mastoporum*, *Ganoderma Lucidum*, *Ganoderma aff. Steyaertam*, *Ganoderma carnosum*, etc... avec des conséquences différentes sur les palmiers à huile.

Au cours de ce stage : douze échantillons de tissus frais de palmier à huile infestés par *Ganoderma*, seize carpophores du genre *Ganoderma* et trois mycéliums purs issus de la souche de référence NJ3 ont été analysés par des méthodes mycologiques et moléculaires.

Concernant les méthodes mycologiques : les méthodes classiques basées sur la description de caractères morphologiques des cultures mycéliennes demeurent incontournables mais ne permettent pas toujours une identification précise. Il a fallu environ dix semaines pour l'obtention d'un mycélium pur de *Ganoderma*. Dans cette étude, l'optimisation d'un milieu de culture favorable à la croissance de mycélium s'est avérée nécessaire notamment pour la plupart des échantillons qui montraient des difficultés à croître sur le milieu Malt-Agar, classiquement utilisé en mycologie.

Concernant les méthodes moléculaires : l'adaptation du protocole du kit Invitrogen est mis en place au laboratoire a permis une extraction optimale. La concentration et la pureté des ADN totaux extraits ont été estimées et les quantités d'ADN obtenues varient de 12 à 7141ng/ml. Ainsi l'ADN des 27 isolats de *Ganoderma* et des 3 isolats de référence NJ3 ont pu être extraits et amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Mots clés : *Ganoderma*, palmier à huile, mycologie, extraction de l'ADN fongique, PCR.

The *Ganoderma Boninense* species is well known to be involved to the basal stem rot disease in oil palm. The kind *Ganoderma* is characterised by a high diversity of species such as *Ganoderma Australe*, *Ganoderma Mastoporum*, *Ganoderma Lucidum*, *Ganoderma aff. Steyaertam*, *Ganoderma carnosum*, etc...